

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Brigitte BATHE, et al.

SERIAL NO: New Application

FILED: Herewith

FOR: NUCLEOTIDE SEQUENCES WHICH CODE FOR THE METE GENE

GAU:

EXAMINER:



REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS  
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☒ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number 60/294,250, filed May 31, 2001, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
Germany	100 38 023.9	August 2, 2000
Germany	101 09 689.5	February 28, 2001

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .  
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and  
(B) Application Serial No.(s)
- ☐ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.

*Norman Paul Oblon*

*NORMAN PAUL OBLON Reg. No. 40,211*

Norman F. Oblon

Registration No. 24,618

Robert W. Hahl

Registration No. 33,893



22850

Tel. (703) 413-3000  
Fax. (703) 413-2220  
(OSMMN 10/98)



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 100 38 023.9

**Anmeldetag:** 02. August 2000

**Anmelder/Inhaber:** Degussa AG, Düsseldorf/DE

Erstanmelder: Degussa-Hüls Aktiengesellschaft,  
Frankfurt am Main/DE

**Bezeichnung:** Neue für das metE-Gen kodierende  
Nukleotidsequenzen

**IPC:** C 07 H, C 12 P, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 15. Juni 2001  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident

Im Auftrag

Weilmann

## Neue für das metE-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das metE-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, unter Verwendung von Bakterien, in denen das metE-Gen verstärkt wird.

### Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere *Corynebacterium glutamicum*, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellungsverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z.B. die Methionin-Analoga  $\alpha$ -Methyl-Methionin, Ethionin, Norleucin, N-acetylnorleucin, S-Trifluoromethylhomocystein, 2-amino-5-heprenoitsäure, Seleno-Methionin, Methioninsulfoximin, Methoxin, 1-Aminocyclopentan-Carboxylsäure oder auxotroph für

regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und Aminosäuren wie z.B. L-Methionin produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure produzierender Stämme von *Corynebacterium* eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

#### Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, bereitzustellen.

#### Beschreibung der Erfindung

Werden im folgenden L-Methionin oder Methionin erwähnt, sind damit auch die Salze wie z.B. Methionin-Hydrochlorid oder Methion-Sulfat gemeint.

Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das metE-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15  
 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz  
 von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der  
 5 Homocystein-Methyltransferase I aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte  
 Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine  
 replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- 10 (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1,  
 oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i)  
 innerhalb des Bereichs der Degeneration des  
 genetischen Kodes entspricht, oder
- 15 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz  
 (i) oder (ii) komplementären Sequenz  
 hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind

ein Polynukleotid enthaltend die Nukleo-  
 20 tidsequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid  
 kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2  
 dargestellt, enthält;

ein Vektor, enthaltend das erfindungsgemäße Polynukleotid,  
 25 insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor, und

als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die den  
 Vektor enthalten oder in denen das metE-Gen verstärkt  
 ist.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank, die das vollständige Gen mit  
 5 der Polynukleotidsequenz entsprechend SEQ ID No. 1 enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des genannten Polynukleotids gemäß SEQ ID No. 1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten DNA-Sequenz.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind als  
 10 Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren bzw. Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für Homocystein-Methyltransferase I kodieren, oder um solche Nukleinsäuren bzw. Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der  
 15 Sequenz mit der des Homocystein-Methyltransferase I-Gens aufweisen.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann,  
 20 die für Homocystein-Methyltransferase I kodieren.

Solche, als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide, enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit  
 25 einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es  
 30 sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität der Homocystein-Methyltransferase I und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders die zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren, und in denen die für das metE-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung Corynebacterium handeln. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art Corynebacterium glutamicum zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.



Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

- 5 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032
- Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC15806
- Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870
- Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539
- Corynebacterium melassecola* ATCC17965
- Brevibacterium flavum* ATCC14067
- 10 *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 und
- Brevibacterium divaricatum* ATCC14020

oder daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten beziehungsweise Stämme, wie beispielsweise der L-Methionin produzierende Stamm

- 15 *Corynebacterium glutamicum* ATCC21608.

Den Erfindern gelang es, das neue, für das Enzym Homocystein-Methyltransferase I (EC 2.1.1.14) kodierende *metE*-Gen von *C. glutamicum* zu isolieren.

- 20 Zur Isolierung des *metE*-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt.
- Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine
- 25 Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank
- ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et
- 30 al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in  $\lambda$ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al.,



1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im E. coli K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pH79 (Hohn und Collins, Gene 11, 291-298 (1980)). Zur Herstellung einer Genbank von C. glutamicum in E. coli können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche E. coli Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 $\alpha$ mc<sup>r</sup>, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Auf diese Weise wurde die neue für das Gen metE kodierende DNA-Sequenz von C. glutamicum erhalten, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des metE-Genproduktes dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID

5 No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner

10 grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann

15 unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der

20 Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der

25 Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

30 Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al.

35 (International Journal of Systematic Bacteriology (1991))

41: 255-260). Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Überexpression des metE-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, produzieren.

10 Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise  
15 wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen L-Methionin-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer  
20 der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom  
25 integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei  
30 Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei  
35 Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei

- Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.
- 10 Zur Verstärkung wurde das erfindungsgemäße metE-Gen beispielhaft mit Hilfe von episomalen Plasmiden überexprimiert. Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren wie z.B. pZ1 (Menkel et al., 15 Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren wie z.B. solche, die auf pCG4 20 (US-A 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.
- Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe 25 derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons 30 beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise E. coli), nicht aber in C. glutamicum replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), 35 pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73

(1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-A 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"-Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

Zusätzlich kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin vorteilhaft sein, neben dem metE-Gen eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus oder des Aminosäure-Exports zu verstärken.

So kann beispielsweise für die Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 30 • das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende gap-Gen (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Triosephosphat Isomerase kodierende tpi-Gen (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),

- das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende pgk-Gen (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Pyruvat Carboxylase kodierende pyc-Gen (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 5 • das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende lysC-Gen (Accession No.P26512),
- das für die Homoserin O-Acetyltransferase kodierende Gen metA (ACCESSION Number AF052652),
- 10 • das für die Cystahionin-gamma-Synthase kodierende Gen metB (ACCESSION Number AF126953),
- das für die Cystahionin-gamma-Lyase kodierende Gen aecD (ACCESSION Number M89931)
- das für die Serin-Hydroxymethyltransferase kodierende glyA-Gen (JP-A-08107788),
- 15 • das für die O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase kodierende metY-Gen (DSM 13556)

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, vorteilhaft sein, zusätzlich zur  
20 Verstärkung des metE Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Homoserine - Kinase kodierende thrB-Gen (ACCESSION Number P08210),
- 25 • das für die Threonin Dehydratase kodierende ilvA-Gen (ACCESSION Number Q04513),
- das für die Threonin Synthase kodierende thrC-Gen (ACCESSION Number P23669),



- das für die Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase kodierende ddh-Gen (ACCESSION Number Y00151),
- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende pck-Gen (DE 199 50 409.1; DSM 13047),
- 5 • das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende pgi-Gen (US 09/396,478; DSM 12969),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende poxB-Gen (DE: 1995 1975.7; DSM 13114)

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

- 10 Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, vorteilhaft sein, neben der Überexpression des metE-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: Overproduction of Microbial Products,
- 15 Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

- Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder
- 20 repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik
- 25 (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

- Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen
- 30 von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der



American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachstumsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie

z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die Analyse von L-Methionin kann durch Ionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

#### Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

Chromosomale DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of

Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma  
 Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1  
 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem  
 Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg,  
 5 Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02)  
 gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase  
 dephosphoryliert.

Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym  
 BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,  
 10 Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten.  
 Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der  
 behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-  
 DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,  
 Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04)  
 15 behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit  
 Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La  
 Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing  
 Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al.  
 20 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen  
 in 10 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen und mit einem Aliquot der  
 Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der  
 Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular  
 Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor)  
 25 beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar  
 (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 mg/l Ampicillin  
 ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C  
 wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

### Beispiel 2

#### 30 Isolierung und Sequenzierung des metE-Gens

Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep  
 Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden,  
 Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem

Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 $\alpha$ MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems

(Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet.  
Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der  
Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF  
Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1,  
5 Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377"  
Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt,  
Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter  
Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids  
10 Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die  
Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem  
zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte  
Kodierbereichsanalyse wurde mit dem Programm XNIP (Staden,  
1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

15 Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1  
dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein  
offenes Leseraster von 2235 Basenpaaren, welches als metE-  
Gen bezeichnet wurde. Das metE-Gen kodiert für ein Protein  
von 745 Aminosäuren.

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Degussa-Hüls AG

5 &lt;120&gt; Neue für das metE-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

&lt;130&gt; 000361 BT

&lt;140&gt;

10 &lt;141&gt;

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

15

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 2810

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

20

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (317)..(2551)

&lt;223&gt; metE Gen

25

&lt;400&gt; 1

agcccaaaac ggcaccatga atttaaattcc ccggaacttc ttgacagacc gagcagtcta 60

30

gggtttgggtt gaaaacgcaa tcggttcact tttaatcctc tccctggagc cccggatgat 120

gaggaacgcc aaagctttct gaattggaaat ttttaagcgtt aagtgggacg acctcgatta 180

caaaaaggcg aggaaccccc cgggggcagct ttctgccacc cggtgatttc gcgaaccttg 240

35

aaacatcgtc agaagattgc cgtgcgtcct agccgggatc cgcacgttcg gctcaagcag 300

aaagtcttta actcac atg act tcc aac ttt tct tcc act gtc gct ggt ctt 352

Met Thr Ser Asn Phe Ser Ser Thr Val Ala Gly Leu

1

5

10

40

cct cgc atc gga gcg aag cgt gaa ctg aag ttc gcg ctc gaa ggc tac 400

Pro Arg Ile Gly Ala Lys Arg Glu Leu Lys Phe Ala Leu Glu Gly Tyr

15

20

25

45

tgg aat gga tca att gaa ggt cgc gaa ctt gcg cag acc gcc cgc caa 448

Trp Asn Gly Ser Ile Glu Gly Arg Glu Leu Ala Gln Thr Ala Arg Gln

30

35

40

50

ttg gtc aac act gca tcg gat tct ttg tct gga ttg gat tcc gtt ccg 496

Leu Val Asn Thr Ala Ser Asp Ser Leu Ser Gly Leu Asp Ser Val Pro

45

50

55

60

55

ttt gca gga cgt tcc tac tac gac gca atg ctc gat acc gcc gct att 544

Phe Ala Gly Arg Ser Tyr Tyr Asp Ala Met Leu Asp Thr Ala Ala Ile

65

70

75

ttg ggt gtg ctg ccg gag cgt ttt gat gac atc gct gat cat gaa aac 592

Leu Gly Val Leu Pro Glu Arg Phe Asp Asp Ile Ala Asp His Glu Asn

80

85

90

	gat ggt ctc cca ctg tgg att gac cgc tac ttt ggc gct gct cgc ggt	640
	Asp Gly Leu Pro Leu Trp Ile Asp Arg Tyr Phe Gly Ala Ala Arg Gly	
	95 100 105	
5	act gag acc ctg cct gca cag gca atg acc aag tgg ttt gat acc aac	688
	Thr Glu Thr Leu Pro Ala Gln Ala Met Thr Lys Trp Phe Asp Thr Asn	
	110 115 120	
10	tac cac tac ctc gtg ccg gag ttg tct gcg gat aca cgt ttc gtt ttg	736
	Tyr His Tyr Leu Val Pro Glu Leu Ser Ala Asp Thr Arg Phe Val Leu	
	125 130 135 140	
15	gat gcg tcc gcg ctg att gag gat ctc cgt tgc cag cag gtt cgt ggc	784
	Asp Ala Ser Ala Leu Ile Glu Asp Leu Arg Cys Gln Gln Val Arg Gly	
	145 150 155	
20	gtt aat gcc cgc cct gtt ctg gtt ggt cca ctg act ttc ctt tcc ctt	832
	Val Asn Ala Arg Pro Val Leu Val Gly Pro Leu Thr Phe Leu Ser Leu	
	160 165 170	
25	gct cgc acc act gat ggt tcc aat cct ttg gat cac ctg cct gca ctg	880
	Ala Arg Thr Thr Asp Gly Ser Asn Pro Leu Asp His Leu Pro Ala Leu	
	175 180 185	
30	ttt gag gtc tac gag cgc ctc atc aag tct ttc gat act gag tgg gtt	928
	Phe Glu Val Tyr Glu Arg Leu Ile Lys Ser Phe Asp Thr Glu Trp Val	
	190 195 200	
35	cag atc gat gag cct gcg ttg gtc acc gat gtt gct cct gag gtt ttg	976
	Gln Ile Asp Glu Pro Ala Leu Val Thr Asp Val Ala Pro Glu Val Leu	
	205 210 215 220	
40	gag cag gtc cgc gct ggt tac acc act ttg gct aag cgc gat ggc gtg	1024
	Glu Gln Val Arg Ala Gly Tyr Thr Thr Leu Ala Lys Arg Asp Gly Val	
	225 230 235	
45	ttt gtc aat act tac ttc ggc tct ggc gat cag gcg ctg aac act ctt	1072
	Phe Val Asn Thr Tyr Phe Gly Ser Gly Asp Gln Ala Leu Asn Thr Leu	
	240 245 250	
50	gcg ggc atc ggc ctt ggc gcg att ggc gtt gac ttg gtc acc cat ggc	1120
	Ala Gly Ile Gly Leu Gly Ala Ile Gly Val Asp Leu Val Thr His Gly	
	255 260 265	
55	gtc act gag ctt gct gcg tgg aag ggt gag gag ctg ctg gtt gcg ggc	1168
	Val Thr Glu Leu Ala Ala Trp Lys Gly Glu Glu Leu Leu Val Ala Gly	
	270 275 280	
60	atc gtt gat ggt cgt aac att tgg cgc acc gac ctg tgt gct gct ctt	1216
	Ile Val Asp Gly Arg Asn Ile Trp Arg Thr Asp Leu Cys Ala Ala Leu	
	285 290 295 300	
65	gct tcc ctg aag cgc ctg gca gct cgc ggc cca atc gca gtg tct acc	1264
	Ala Ser Leu Lys Arg Leu Ala Ala Arg Gly Pro Ile Ala Val Ser Thr	
	305 310 315	



	tct	tgt	tca	ctg	ctg	cac	gtt	cct	tac	acc	ctc	gag	gct	gag	aac	att	1312
	Ser	Cys	Ser	Leu	Leu	His	Val	Pro	Tyr	Thr	Leu	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	
				320					325					330			
5	gag	cct	gag	gtc	cgc	gac	tgg	ctt	gcc	ttc	ggc	tcg	gag	aag	atc	acc	1360
	Glu	Pro	Glu	Val	Arg	Asp	Trp	Leu	Ala	Phe	Gly	Ser	Glu	Lys	Ile	Thr	
			335					340					345				
10	gag	gtc	aag	ctg	ctt	gcc	gac	gcc	cta	gcc	ggc	aac	atc	gac	gcg	gct	1408
	Glu	Val	Lys	Leu	Leu	Ala	Asp	Ala	Leu	Ala	Gly	Asn	Ile	Asp	Ala	Ala	
		350					355					360					
15	gcg	ttc	gat	gcg	gcg	tcc	gca	gca	att	gct	tct	cga	cgc	acc	tcc	cca	1456
	Ala	Phe	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Ile	Ala	Ser	Arg	Arg	Thr	Ser	Pro	
	365					370					375					380	
20	cgc	acc	gca	cca	atc	acg	cag	gaa	ctc	cct	ggc	cgt	agc	cgt	gga	tcc	1504
	Arg	Thr	Ala	Pro	Ile	Thr	Gln	Glu	Leu	Pro	Gly	Arg	Ser	Arg	Gly	Ser	
					385					390					395		
25	ttc	gac	act	cgt	gtt	acg	ctg	cag	gag	aag	tca	ctg	gag	ctt	cca	gct	1552
	Phe	Asp	Thr	Arg	Val	Thr	Leu	Gln	Glu	Lys	Ser	Leu	Glu	Leu	Pro	Ala	
				400				405						410			
30	ctg	cca	acc	acc	acc	att	ggt	tct	ttc	cca	cag	acc	cca	tcc	att	cgt	1600
	Leu	Pro	Thr	Thr	Thr	Ile	Gly	Ser	Phe	Pro	Gln	Thr	Pro	Ser	Ile	Arg	
			415				420						425				
35	tct	gct	cgc	gct	cgt	ctg	cgc	aag	gaa	tcc	atc	act	ttg	gag	cag	tac	1648
	Ser	Ala	Arg	Ala	Arg	Leu	Arg	Lys	Glu	Ser	Ile	Thr	Leu	Glu	Gln	Tyr	
		430				435					440						
40	gaa	gag	gca	atg	cgc	gaa	gaa	atc	gat	ctg	gtc	atc	gcc	aag	cag	gaa	1696
	Glu	Glu	Ala	Met	Arg	Glu	Glu	Ile	Asp	Leu	Val	Ile	Ala	Lys	Gln	Glu	
	445					450					455					460	
45	gaa	ctt	ggt	ctt	gat	gtg	ttg	gtt	cac	ggt	gag	cca	gag	cgc	aac	gac	1744
	Glu	Leu	Gly	Leu	Asp	Val	Leu	Val	His	Gly	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Asp	
				465						470					475		
50	atg	gtt	cag	tac	ttc	tct	gaa	ctt	ctc	gac	ggt	ttc	ctc	tca	acc	gcc	1792
	Met	Val	Gln	Tyr	Phe	Ser	Glu	Leu	Leu	Asp	Gly	Phe	Leu	Ser	Thr	Ala	
			480					485						490			
55	aac	ggc	tgg	gtc	caa	agc	tac	ggc	tcc	cgc	tgt	gtt	cgt	cct	cca	gtg	1840
	Asn	Gly	Trp	Val	Gln	Ser	Tyr	Gly	Ser	Arg	Cys	Val	Arg	Pro	Pro	Val	
			495					500					505				
60	ttg	ttc	gga	aac	gtt	tcc	cgc	cca	gcg	cca	atg	act	gtc	aag	tgg	ttc	1888
	Leu	Phe	Gly	Asn	Val	Ser	Arg	Pro	Ala	Pro	Met	Thr	Val	Lys	Trp	Phe	
		510					515					520					
65	cag	tac	gca	cag	agc	ctg	acc	cag	aag	cat	gtc	aag	gga	atg	ctc	acc	1936
	Gln	Tyr	Ala	Gln	Ser	Leu	Thr	Gln	Lys	His	Val	Lys	Gly	Met	Leu	Thr	
	525					530					535				540		
70	ggt	cca	gtc	acc	atc	ctt	gca	tgg	tcc	ttc	gtt	cgc	gat	gat	cag	ccg	1984
	Gly	Pro	Val	Thr	Ile	Leu	Ala	Trp	Ser	Phe	Val	Arg	Asp	Asp	Gln	Pro	
					545					550					555		

	ctg gct acc act gct gac cag gtt gca ctg gca ctg cgc gat gaa att	2032
	Leu Ala Thr Thr Ala Asp Gln Val Ala Leu Ala Leu Arg Asp Glu Ile	
	560 565 570	
5	aac gat ctc atc gag gct ggc gcg aag atc atc cag gtg gat gag cct	2080
	Asn Asp Leu Ile Glu Ala Gly Ala Lys Ile Ile Gln Val Asp Glu Pro	
	575 580 585	
10	gcg att cgt gaa ctg ttg ccg cta cga gac gtc gat aag cct gcc tac	2128
	Ala Ile Arg Glu Leu Leu Pro Leu Arg Asp Val Asp Lys Pro Ala Tyr	
	590 595 600	
15	ctg cag tgg tcc gtg gac tcc ttc cgc ctg gcg act gcc ggc gca ccc	2176
	Leu Gln Trp Ser Val Asp Ser Phe Arg Leu Ala Thr Ala Gly Ala Pro	
	605 610 615 620	
20	gac gac gtc caa atc cac acc cac atg tgc tac tcc gag ttc aac gaa	2224
	Asp Asp Val Gln Ile His Thr His Met Cys Tyr Ser Glu Phe Asn Glu	
	625 630 635	
25	gtg atc tcc tcg gtc atc gcg ttg gat gcc gat gtc acc acc atc gaa	2272
	Val Ile Ser Ser Val Ile Ala Leu Asp Ala Asp Val Thr Thr Ile Glu	
	640 645 650	
30	gca gca cgt tcc gac atg cag gtc ctc gct gct ctg aaa tct tcc ggc	2320
	Ala Ala Arg Ser Asp Met Gln Val Leu Ala Ala Leu Lys Ser Ser Gly	
	655 660 665	
35	ttc gag ctc ggc gtc gga cct ggt gtg tgg gat atc cac tcc ccg cgc	2368
	Phe Glu Leu Gly Val Gly Pro Gly Val Trp Asp Ile His Ser Pro Arg	
	670 675 680	
40	gtt cct tcc gcg cag gaa gtg gac ggt ctc ctc gag gct gca ctg cag	2416
	Val Pro Ser Ala Gln Glu Val Asp Gly Leu Leu Glu Ala Ala Leu Gln	
	685 690 695 700	
45	tcc gtg gat cct cgc cag ctg tgg gtc aac cca gac tgt ggt ctg aag	2464
	Ser Val Asp Pro Arg Gln Leu Trp Val Asn Pro Asp Cys Gly Leu Lys	
	705 710 715	
50	acc cgt gga tgg cca gaa gtg gaa gct tcc cta aag gtt ctc gtt gag	2512
	Thr Arg Gly Trp Pro Glu Val Glu Ala Ser Leu Lys Val Leu Val Glu	
	720 725 730	
55	tcc gct aag cag gct cgt gag aaa atc gga gca act atc taaattgggt	2561
	Ser Ala Lys Gln Ala Arg Glu Lys Ile Gly Ala Thr Ile	
	735 740 745	
50	taccgctagg aacccaaaga ttaagggcac gagtgtcacc aggattgccg cacccatggc	2621
	aacaccgaag gacaccgtgc ccactcctat ttgcatcaca gcgcccaagg tagcggcgcc	2681
	caaaacagcg cccacctggc gtgaggtgtt gtaaaaacca gaagcagagc ccaactaaatc	2741
55	ctgcggaaca tcacgcagag caatcacaga gttcggtgca aaactcatcg cgttggagct	2801
	accgaacaa	2810

<210> 2  
 <211> 745  
 5 <212> PRT  
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 2  
 10 Met Thr Ser Asn Phe Ser Ser Thr Val Ala Gly Leu Pro Arg Ile Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Lys Arg Glu Leu Lys Phe Ala Leu Glu Gly Tyr Trp Asn Gly Ser  
 20 25 30  
 15 Ile Glu Gly Arg Glu Leu Ala Gln Thr Ala Arg Gln Leu Val Asn Thr  
 35 40 45  
 Ala Ser Asp Ser Leu Ser Gly Leu Asp Ser Val Pro Phe Ala Gly Arg  
 50 55 60  
 20 Ser Tyr Tyr Asp Ala Met Leu Asp Thr Ala Ala Ile Leu Gly Val Leu  
 65 70 75 80  
 Pro Glu Arg Phe Asp Asp Ile Ala Asp His Glu Asn Asp Gly Leu Pro  
 85 90 95  
 25 Leu Trp Ile Asp Arg Tyr Phe Gly Ala Ala Arg Gly Thr Glu Thr Leu  
 100 105 110  
 30 Pro Ala Gln Ala Met Thr Lys Trp Phe Asp Thr Asn Tyr His Tyr Leu  
 115 120 125  
 Val Pro Glu Leu Ser Ala Asp Thr Arg Phe Val Leu Asp Ala Ser Ala  
 130 135 140  
 35 Leu Ile Glu Asp Leu Arg Cys Gln Gln Val Arg Gly Val Asn Ala Arg  
 145 150 155 160  
 Pro Val Leu Val Gly Pro Leu Thr Phe Leu Ser Leu Ala Arg Thr Thr  
 165 170 175  
 40 Asp Gly Ser Asn Pro Leu Asp His Leu Pro Ala Leu Phe Glu Val Tyr  
 180 185 190  
 45 Glu Arg Leu Ile Lys Ser Phe Asp Thr Glu Trp Val Gln Ile Asp Glu  
 195 200 205  
 Pro Ala Leu Val Thr Asp Val Ala Pro Glu Val Leu Glu Gln Val Arg  
 210 215 220  
 50 Ala Gly Tyr Thr Thr Leu Ala Lys Arg Asp Gly Val Phe Val Asn Thr  
 225 230 235 240  
 Tyr Phe Gly Ser Gly Asp Gln Ala Leu Asn Thr Leu Ala Gly Ile Gly  
 245 250 255  
 55 Leu Gly Ala Ile Gly Val Asp Leu Val Thr His Gly Val Thr Glu Leu  
 260 265 270

	Ala	Ala	Trp	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	Leu	Val	Ala	Gly	Ile	Val	Asp	Gly	
			275					280					285				
5	Arg	Asn	Ile	Trp	Arg	Thr	Asp	Leu	Cys	Ala	Ala	Leu	Ala	Ser	Leu	Lys	
		290					295					300					
	Arg	Leu	Ala	Ala	Arg	Gly	Pro	Ile	Ala	Val	Ser	Thr	Ser	Cys	Ser	Leu	
	305					310					315					320	
10	Leu	His	Val	Pro	Tyr	Thr	Leu	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Glu	Pro	Glu	Val	
					325					330					335		
	Arg	Asp	Trp	Leu	Ala	Phe	Gly	Ser	Glu	Lys	Ile	Thr	Glu	Val	Lys	Leu	
15				340					345					350			
	Leu	Ala	Asp	Ala	Leu	Ala	Gly	Asn	Ile	Asp	Ala	Ala	Ala	Phe	Asp	Ala	
			355					360					365				
20	Ala	Ser	Ala	Ala	Ile	Ala	Ser	Arg	Arg	Thr	Ser	Pro	Arg	Thr	Ala	Pro	
		370					375					380					
	Ile	Thr	Gln	Glu	Leu	Pro	Gly	Arg	Ser	Arg	Gly	Ser	Phe	Asp	Thr	Arg	
	385					390					395					400	
25	Val	Thr	Leu	Gln	Glu	Lys	Ser	Leu	Glu	Leu	Pro	Ala	Leu	Pro	Thr	Thr	
					405					410					415		
	Thr	Ile	Gly	Ser	Phe	Pro	Gln	Thr	Pro	Ser	Ile	Arg	Ser	Ala	Arg	Ala	
30				420					425					430			
	Arg	Leu	Arg	Lys	Glu	Ser	Ile	Thr	Leu	Glu	Gln	Tyr	Glu	Glu	Ala	Met	
			435					440					445				
35	Arg	Glu	Glu	Ile	Asp	Leu	Val	Ile	Ala	Lys	Gln	Glu	Glu	Leu	Gly	Leu	
		450					455					460					
	Asp	Val	Leu	Val	His	Gly	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Asp	Met	Val	Gln	Tyr	
	465					470					475					480	
40	Phe	Ser	Glu	Leu	Leu	Asp	Gly	Phe	Leu	Ser	Thr	Ala	Asn	Gly	Trp	Val	
					485					490					495		
	Gln	Ser	Tyr	Gly	Ser	Arg	Cys	Val	Arg	Pro	Pro	Val	Leu	Phe	Gly	Asn	
45				500					505					510			
	Val	Ser	Arg	Pro	Ala	Pro	Met	Thr	Val	Lys	Trp	Phe	Gln	Tyr	Ala	Gln	
			515					520					525				
50	Ser	Leu	Thr	Gln	Lys	His	Val	Lys	Gly	Met	Leu	Thr	Gly	Pro	Val	Thr	
		530					535					540					
	Ile	Leu	Ala	Trp	Ser	Phe	Val	Arg	Asp	Asp	Gln	Pro	Leu	Ala	Thr	Thr	
	545					550					555					560	
55	Ala	Asp	Gln	Val	Ala	Leu	Ala	Leu	Arg	Asp	Glu	Ile	Asn	Asp	Leu	Ile	
					565				570					575			
	Glu	Ala	Gly	Ala	Lys	Ile	Ile	Gln	Val	Asp	Glu	Pro	Ala	Ile	Arg	Glu	
				580					585					590			



## Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien,  
enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus  
5 der Gruppe
  - a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist  
mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid  
kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2  
enthält,
  - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das  
eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%  
identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID  
No. 2,
  - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den  
15 Polynukleotiden von a) oder b), und
  - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15  
aufeinanderfolgende Nukleotide der  
Polynukleotidsequenz von a), b) oder c).
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid  
20 eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt  
rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid  
eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die  
25 Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
  - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder
  - (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz
    - (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des  
30 genetischen Kodes entspricht, oder

(iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls

(iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).

- 5 6. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 2, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz in SEQ ID No. 2 darstellt, enthält.
7. Coryneforme Bakterien, in denen das metE-Gen verstärkt, insbesondere überexprimiert wird.
- 10 8. Als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 trägt.
9. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin,  
15 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte durchführt:
  - a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man  
20 zumindest das metE-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert;
  - b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und
  - c) Isolieren der L-Aminosäure.
- 25 10. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.



11. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
 daß man Bakterien einsetzt, in denen die  
 Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet  
 5 sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure  
 verringern.
12. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
 daß man einen mit einem Plasmidvektor transformierten  
 10 Stamm einsetzt, und der Plasmidvektor die für das metE-  
 Gen kodierende Nukleotidsequenz trägt.
13. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
 daß man die Expression des (der) Polynukleotides (e),  
 15 das (die) für das metE-Gen kodiert (kodieren)  
 verstärkt, insbesondere überexprimiert.
14. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
 daß man die katalytischen Eigenschaften des Polypeptids  
 20 (Enzymprotein) erhöht, für das das Polynukleotid metE  
 kodiert.
15. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
 daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere  
 25 L-Methionin, coryneformen Mikroorganismen fermentiert,  
 in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene,  
 ausgewählt aus der Gruppe
  - 15.1 das für eine feed back resistente  
 Aspartatkinase kodierende Gen lysC,
  - 30 15.2 das für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat  
 Dehydrogenase kodierende Gen gap,

- 15.3 das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk,
- 15.4 das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc,
- 5 15.5 das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi
- 15.6 das für die Homoserin O-Acetyltransferase kodierende Gen metA
- 10 15.7 das für die Cystahionin-gamma-Synthase kodierende Gen metB
- 15.8 das für die Cystahionin-gamma-Lyase kodierende Gen aecD
- 15.9 das für die Serin-Hydroxymethyltransferase kodierende Gen glyA
- 15 15.10 das für die O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase kodierende Gen metY

verstärkt bzw. überexprimiert.

- 16. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
20 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, corynéformen Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 25 16.1 das für die Homoserine - Kinase kodierende Gen thrB
- 16.2 das für die Threonin Dehydratase kodierende Gen ilvA

- 16.3 das für die Threonin Synthase kodierende Gen thrC
- 16.4 das für die Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase kodierende Gen ddh
- 5 16.5 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck
- 16.6 das für die Glucose-6-Phosphat6 Isomerase kodierende Gen pgi
- 16.7 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB
- 10 abschwächt.
17. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,  
 15 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
 daß man Mikroorganismen der Art Corynebacterium glutamicum einsetzt.
18. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die für Homocystein-Methyltransferase I  
 20 kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des Homocystein-Methyltransferase I Gens aufweisen,  
 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
 daß man die Polynukleotidsequenzen gemäß Anspruch 1, 2, 3 oder 4 als Hybridisierungssonden einsetzt.

## Neue für das metE-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

und Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das metE-Gen verstärkt vorliegt, und die Verwendung der Polynukleotidsequenzen als Hybridisierungssonden.